

WO2009507

Publication Title:

No title available

Abstract:

Abstract not available for WO2009507 Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Februar 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/09507 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A01K 67/027**, A61K 48/00, 35/12, 35/28, C07K 16/46

(81) Bestimmungsstaaten (national): AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07239

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juli 2000 (27.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): APOGENE GMBH & CO. KG [DE/DE];

Thalmannsdorf 25, Larezhausen, D-86567 Hilgertshausen (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BREM, Gottfried [DE/DE]; ApoGene GmbH & Co. KG, Thalmannsdorf 25, Larezhausen, D-86567 Hilgertshausen (DE).

(74) Anwalt: STRAUS, Alexander; Becker, Kurig, Straus, Bavariastrasse 7, 80336 München (DE).

(54) Title: SOMATIC CLONING GENE TRANSFER FOR THE PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS, CELLS AND ORGANS

(54) Bezeichnung: SOMATISCHER KLONIERUNGS-GENTRANSFER ZUR PRODUKTION VON REKOMBINANTEN PROTEINEN, ZELLEN UND ORGANEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for recombinant production of substances, wherein cells are transformed with a nucleotide sequence coding said substance, the transformed cells are cloned and the cells thus obtained are inserted into a receiving organism. More particularly, the invention relates to the use of said method in the production of recombinant proteins, cells and tissues. The invention further relates to a method wherein cells of an individual are isolated, said cells are inserted into an immune-incompetent animal for further growth and the cells, tissue and/or organs which have grown in the animal are re-isolated and inserted into an individual.

WO 02/09507 A1

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Stoffen, bei dem Zellen mit einer den Stoff codierenden Nukleotidsequenz transformiert werden, die transformierten Zellen einem Klonierungsprozess unterworfen werden, und die so erhaltenen Zellen in einen Empfängerorganismus eingebracht werden. Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere die Nutzung des Verfahrens bei der Produktion rekombinanter Proteine, Zellen und Geweben. Gemäss einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren, bei dem Zellen eines Individuums isoliert werden, diese Zellen zum weiteren Wachstum in ein immuninkompetentes Tier eingebracht werden und die in dem Tier gewachsenen Zellen, Gewebe und/oder Organe wieder isoliert und in ein Individuum eingebracht werden.

Somatischer Klonierungs-Gentransfer zur Produktion von
rekombinanten Proteinen, Zellen und Organen

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Stoffen, bei dem Zellen mit einer den Stoff codierenden Nukleotidsequenz transformiert werden, die transformierten Zellen einem Klonierungsprozess unterworfen werden, und die so erhaltenen 10 Zellen in einen Empfängerorganismus eingebracht werden. Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere die Nutzung des Verfahrens bei der Produktion rekombinanter Proteine, Zellen und Geweben. Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren, bei dem Zellen eines Individuums isoliert werden, diese Zellen zum weiteren Wachstum in ein immuninkompetentes Tier eingebracht werden und die in dem Tier gewachsenen Zellen, Gewebe 15 und/oder Organe wieder isoliert und in ein Individuum eingebracht werden.

Mit dem Aufkommen der rekombinanten Gentechnologie wurden zur Herstellung nützlicher Stoffe vermehrt biologische Systeme einbezogen. So werden gegenwärtig eine Vielzahl von Proteinen in in vitro Zellkultursystemen hergestellt. Aufgrund der Aufklärung der Nukleotidsequenz des menschlichen Genoms ist zu erwarten, daß die Ermittlung neuer Proteine und deren Rolle im menschlichen Körper gefördert und beschleunigt wird, so daß in naher Zukunft eine Vielzahl neuer Stoffe für medizinische oder sonstige Zwecke zur Verfügung stehen werden, deren Herstellung gewünscht ist. Die Verwendung bestehender in vitro Zellkultursysteme zu diesem Zweck beinhaltet jedoch den Nachteil, daß bis zur optimalen Produktion der entsprechenden Stoffe mindestens 1 bis 2 Jahre vergehen. Darüber hinaus sind derartige Systeme kompliziert zu handhaben, störanfällig und kostenintensiv. So ist beispielsweise eines der größten Schwierigkeiten im großen Maßstab betriebener Zellkultursysteme die Gefahr der Verunreinigung der Kulturlösung.

30 In den letzten Jahren wurden zur Produktion von industriell und pharmazeutisch interessanten Stoffen vermehrt Tiere einbezogen. Dazu wird neben der Erstellung sogenannter Keimbahn-

transgener Tiere der somatische Gentransfer eingesetzt, bei dem eine einen bestimmten Stoff codierende DNA in somatische Zellen des Zielindividuums eingebracht wird. Dies kann entweder in vivo, d.h. im Gesamtorganismus erfolgen, oder in vitro, d.h. im Labor in Zellen, die aus dem Organismus gewonnen wurden und nach Einbringen des Konstrukts in diese Zellen wieder in diesen zurückgeführt werden. Das Konstrukt wird dann im Tier zur Expression gebracht, so daß der Stoff von Interesse in dem Tier seine Wirkung entfalten kann.

Ein dem Transfer von Genkonstrukten in somatische Zellen inhärenter Nachteil liegt jedoch darin, daß das eingebrachte Gen nur in dem behandelten Individuum zur Expression bzw. 10 Wirkung kommt und auf die Lebensdauer der transformierten Zellen beschränkt ist. Eine Übertragung auf Folgegenerationen ist ausgeschlossen.

Beim somatischen Gentransfer zusätzlich auftretende Probleme sind insbesondere eine oft nur unter großen Mühen erreichbare ausreichend große Zahl an spezifischen Zielzellen mit stabiler 15 Transfektion, sowie die Zufälligkeit der Integration des eingebrachten Konstrukts, die die Eigenschaften und/oder das Verhalten der Zielzellen negativ beeinflussen kann. Weiterhin treten häufig Probleme hinsichtlich einer ungenügenden Expression des durch das eingebrachte Konstrukt codierten Polypeptids auf, was neben den auf der DNA-Ebene liegenden Schwierigkeiten auch auf bestimmte intra- und extrazelluläre Barrieren zurückzuführen sein kann und jeweils ausgetestet werden muß. Die vorstehend beschriebenen Probleme schränken daher die Nutzung der 20 Anwendungsmöglichkeiten des somatischen Gentransfers in der Biotechnologie im weitesten Sinne und in der Nutztierproduktion im speziellen erheblich ein.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin die Nachteile des Standes der 25 Technik zu vermeiden und ein neues Verfahren zur Herstellung von bestimmten interessanten Stoffen zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Stoffen, bei dem in einem ersten Schritt Zellen mit einer den Stoff codierenden Nukleotidsequenz 30 transformiert werden, die transformierten Zellen einem Klonierungsprozess unterworfen werden, und die in dem Klonierungsschritt erhaltenen Zellen in einen Empfängerorganismus eingebracht werden.

- Die in dem ersten Verfahrensschritt eingesetzten Zellen können jedwede, aus einem Individuum isolierte Zellen sein, die einem Klonierungsprozess unterworfen werden können. Beispiele hierfür sind insbesondere fetale oder adulte Fibroblasten, primordiale Keimzellen,
5 Granulosazellen, Thymozyten, Milzzellen, Leberzellen, Makrophagen, Hoden oder Ovarzellen etc.. Die Zellen können als solche, wie isoliert, oder in Kultur gehalten eingesetzt werden, wobei diese auch vor der Transformation einem Klonierungsverfahren unterworfen worden sein können.
- 10 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden die zur Transformation eingesetzten Zellen aus einem bereits vorhandenen Zellklon, einer Zellkultur oder einem Organismus isoliert. Als Zellklon sollen im Sinne der Erfindung in vitro kultivierte, klonierte Zellen, Feten aus Klonierung oder Klontiere verstanden werden.
- 15 Die Zellen werden anschließend mit einer Nukleotidsequenz transformiert, die für den Stoff von Interesse codiert. Als Stoff werden dabei alle im Körper synthetisierbaren Stoffe verstanden, wie Proteine, Polysaccharide, Lipide etc., aber auch die Zellen, Gewebe und Organe, die die eingebrachte Nukleotidsequenz aufweisen. Die für den Stoff codierende Nukleotidsequenz ist daher nicht nur eine den Stoff direkt codierende Sequenz, sondernd auch eine Sequenz, die
20 verschiedenen Polypeptide/Enzyme codiert, die den Stoff von Interesse in den bzw. außerhalb der Zellen bilden. Als rekombinant werden im Sinne der vorliegenden Erfindung Gene bezeichnet, die für das Tier entweder exogen sind oder auch endogen, jedoch mittels rekombinanter Gentechnologie in ihrem Expressionsmuster verändert wurden, wie beispielsweise in ihrem Differenzierungs-spezifischen Expressionsmuster oder der exprimierten Menge.
- 25 Zur Transformation können alle derzeit bekannten Techniken eingesetzt werden, wie physikalische, chemische oder virale Techniken. Im Hinblick auf eine gerichtete Integration des Konstrukts an bestimmten Stellen im Genom ist der Einsatz homologer Rekombination bevorzugt. Sollen große Gencluster in die Empfängerzelle eingebracht werden, so ist auch die Verwendung artifizieller Chromosomen möglich. Auch Zellhybride, wie sie für die Kartierung eingesetzt werden, können erstellt und darauf selektioniert werden, daß sie neben dem Nutztiergenom auch spezifische chromosomal Fragmente aus dem Zielgenom enthalten. Dies ist insbesondere dann

vorteilhaft, wenn ein gesamtes System des Zielgenoms, wie beispielsweise das Immunglobulingsystem, transferiert werden soll.

Die Zellen werden anschließend einem Klonierungsprozess unterworfen. Klonierungsverfahren
5 sind mittlerweile bekannt und beispielsweise in der PCT/EP98/00230 (WO 99/36510), sowie der
PCT/EP/00229 (WO) beschrieben, die hier unter Bezugnahme mit aufgenommen wird. Die
klonierten Zellen werden dann bis zu einem bestimmten Entwicklungsstadium in vivo und/oder in
vitro wachsen gelassen, beispielsweise bis zum Fetus, und dann in den Empfängerorganismus
eingebracht (Schritt c) von Anspruch 1). Gleichermaßen können die klonierten Zellen soweit
10 wachsen gelassen werden, daß eine bestimmte Ausdifferenzierung vorliegt, wobei bereits
bestimmte, ausdifferenzierte Zellen in den Empfängerorganismus eingebracht werden.

Die klonierten Zellen werden anschließend in einen Empfängerorganismus eingebracht, der ein
Tier, ein tierischer Fetus, ein tierisches Embryo bzw. ein tierisches Zellaggregat, sowie auch
15 klonierte Tiere, klonierte tierische Feten, klonierte tierische Embryonen und Zellaggregate sein
kann. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform sind die Ausgangszellen, die transformiert und
einem Klonierungsprozess unterworfen werden, vom gleichen Genotyp wie der Empfänger-
organismus.

20 Ein Vorteil einer derartigen Vorgehensweise ist darin zu sehen, daß ein bereits vorhandener, d.h.
auf Vorrat hergestellter Empfängerorganismus in sehr kurzer Zeit mit Zellen, vorzugsweise vom
gleichen Genotyp, versehen werden kann, die neu zu exprimierende Gene enthalten, und rekombinante Stoffe produzieren. Die dabei im Vergleich zum konventionellen Keimbahngentransfer
zu erzielende Zeitsparnis bis zum Erhalt produktionsreifer Tiere kann bis zu 5 Jahre betragen.
25 Darüber hinaus ist das vorliegende Verfahren unabhängig von der Zeitsparnis und dem
schneller zu erhaltenden Produktionssystem mit der einhergehenden Kostensparnis auch
effizienter, da die produzierenden Organismen kostengünstiger generiert werden können. So ist
es möglich in vitro vorhandene Zellen eines Klons, zu dem auch bereits lebende Tiere vorhanden
sind, als Ausgangszellen für die Transformation einzusetzen und diese nach Transformation und
30 Klonierung in den Empfängerorganismus, welcher, da zum Klon gehörig, inhärent den gleichen
Genotyp aufweist, einzubringen.

Ein weiterer Vorteil des hier beschriebenen, als somatischer Klonierungs-Gentransfer bezeichneten Verfahrens ist auch darin zu sehen, daß auf neue Anforderungen bzw. Bedürfnisse bei der Expression rekombinanter Proteine schnell reagiert werden kann. Im Normalfall dauert es selbst bei Verwendung einer Nutzterspezies mit kurzem Generationsintervall, wie beispielsweise bei einem Kaninchen, mindestens 7 Monate, bis nach Erstellung der Konstrukte ausreichend Material für die ersten Untersuchungen der exprimierten Gene vorhanden ist. Bis zur Produktion des gewünschten Polypeptids ist zusätzlich ein weiteres Jahr erforderlich. Beim Rind dauert der Vorgang, bis mittels transgener Tiere das Polypeptid von Interesse erhalten werden kann, mindestens 3 bis 4 Jahre. Demgegenüber ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren eine erhebliche Verkürzung der Zeit bis bei einem bereits vorhandenem Empfängerorganismus mit einem neuen Konstrukt Zellen transformiert und Expressionsklone geschaffen werden können (Dauer lediglich ein paar Monate).

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht daher in einer zu der in vitro Zellkultur vergleichbaren Zeitspanne zu ersten Proteinmengen für die Analyse zu kommen, wobei erfindungsgemäß zusätzlich bereits ein Produktionssystem zur Verfügung steht, mit dem die gewünschte Substanz produziert werden kann. Die Empfängerorganismen bzw. Tiere können daher schnell zur Herstellung der gewünschten Stoffe verwendet werden.

In bestimmten Fällen ist es vorteilhaft, den vorzugsweise auf Vorrat produzierten oder zu produzierenden Empfängerorganismus spezifisch auf den späteren somatischen Zell-Gentransfer vorzubereiten. Dies ist insbesondere dann erforderlich, wenn den applizierten transgenen oder anders aufbereiteten Zellen gegenüber den im Empfängerorganismus vorhandenen Zellen oder Strukturen einen Vorteil verschafft werden soll, um zu einer besseren Expression oder Ausprägung zu kommen.

Dazu können beispielsweise im Empfängerorganismus bestimmte Zellen, Gewebe oder Organe entfernt werden, was durch physikalische, chemische, immunologische, molekulargenetische oder chirurgische Verfahren erreicht werden kann. Darüber hinaus können Tiere bzw. Feten, die an entscheidenden Genorten homozygot negativ sind (Screen-out Konzept) gezüchtet bzw. auf Vorrat gehalten und nach Bedarf eingesetzt werden.

Eine Möglichkeit zur Depletion von bestimmten Zellen, Geweben oder Organen im Empfängerorganismus besteht darin, bereits transgene Organismen einzusetzen, die ein Konstrukt enthalten, welches unter der Kontrolle eines Entwicklungsstadiums-spezifischen oder eines induzierbaren Promoters liegen. Im ersten Fall wird bei Aktivierung des Promoters während des bestimmten

5 Entwicklungsstadiums automatisch und gewebespezifisch ein Protein gebildet, das zum Absterben/Apoptose der entsprechenden Zellen führt, beispielsweise das Diphtherie-Toxin. Im zweiten Fall wird ein "Suizid"-Genkonstrukt, das einen geeigneten Gewebe-spezifischen Promoter vorgeschaltet hat, durch Applikation eines spezifischen Agens, wie beispielsweise Tetrazyklin oder Ecdyson aktiviert, was zur zeitlich frei bestimmbaren, spezifischen Depletion der Zellen,

10 Geweben oder Organen in dem Empfängerorganismus führt.

Eine einfache Möglichkeit zur Bereitstellung und Propagation derartiger Organismen stellt deren Klonierung dar, mit der das einmal in den Organismus eingebrachte Konstrukt stabil auf Nachkommen weitergegeben werden kann. Es ist klar, daß dadurch jedwede Zellen, Gewebe bzw.

15 Organe in dem Organismus nach Bedarf in deren Proliferation bzw. Entwicklung beeinflusst werden kann.

Als Beispiel einer Depletion bestimmter Zellen kann die Entfernung von Zellen/Gewebe angeführt werden, aus denen normalerweise die Milchdrüse entsteht. Bei der Geburt eines Tieres sind relativ wenige dieser Zellen vorhanden. Diese bilden sich erst im Verlaufe der ersten Trächtigkeit und kurz vor der Geburt kommt es zu einer starken Proliferation und zur Bildung der funktionellen Milchdrüse. Werden daher diese, im frühen Entwicklungsstadium des Empfängerorganismus nur in geringer Anzahl vorhandenen Stammzellen der Mammadrüse in einem tierischen Organismus entfernt und diese entfernten Zellen durch rekombinante (transformierte) Zellen dieses Typs, die eine zusätzliche Expressionskassette zur Synthese eines bestimmten rekombinanten Stoffes von Interesse tragen, ersetzt, so wird erreicht, dass in dem so erhaltenen tierischen Organismus die sich bildende Milchdrüse aus den applizierten transformierten Zellen gebildet wird. Als Folge wird in dem Nutztier auch der rekombinante Stoff in der eingebrachten Mamma-Anlage exprimiert. Die Zeitersparnis bei einem derartigen Vorgehen beträgt ca. 3 Jahre.

30

Ein weiteres Beispiel ist die totale oder teilweise Entfernung der Blutstammzellen oder der Stammzellen des immunologischen Systems aus dem Empfängerorganismus durch beispiels-

weise Bestrahlung oder andere Verfahren und deren Ersatz durch transformierte Stammzellen, die erfindungsgemäß transformiert und einem Klonierungsprozeß unterworfen wurden, und die beispielsweise die Expression humanisierter Antikörpern (AK) oder AK-Fragmente (beispielsweise bispezifische AK) oder anderen tierischen oder menschlichen Blutfaktoren 5 ermöglichen. Werden bei den klonierten Stammzellen in-vitro die Immunglobulingene des Tieres gegen diejenigen des Menschen ausgetauscht und werden diese Zellen mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens in den Empfängerorganismus eingebracht, dann bilden diese Empfängerorganismen polyklonale humanidente Antikörper, die für die Therapie von menschlichen Erkrankungen von großem Wert sind.

10

Darüber hinaus kann mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens für Faktoren, die in den Tieren zwar vorhanden sind, für eine wirtschaftlich interessante Gewinnung jedoch in zu geringer Konzentration vorliegen, ein besonders effizientes und unproblematisches Produktionsystem erstellt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Expression mehrerer Gene der Heparin-15 synthese unter sehr starken Promotoren. Da das Heparin natürlicherweise im Organismus vorhanden ist, würden weder gegen die Zellen, die vorzugsweise dem gleichen Genotyp angehören, noch gegen das Produkt irgendwelche immunologischen Reaktionen hervorgerufen werden.

Die Reklationierung von Zellen kann mindestens dreimal wiederholt werden. Es wurde diesseits 20 gefunden, daß Zellen bis zu 150 Teilungen absolvieren können, d.h. die Zellen aus dem Klonierungsprozeß überleben wesentlich länger als normale Zellen und können deshalb auch nach mehreren Klonierungsvorgängen im Tier mindestens so lange überleben und Gene exprimieren, wie die Lebensspanne des Tieres ist.

25 In analoger Weise und Weiterentwicklung zu den vorstehenden Einsatzgebieten können von einem vorhandenen Tier Zellen gewonnen, und Embryonen, Feten und in vitro kultivierte Zelllinien erstellt werden. Diese Zelllinien werden mit bekannten Methoden genetisch modifiziert. Die Zellen werden dann direkt in der in-vitro-Kultur differenziert oder nach nochmaliger Klonierung aus Feten-Organen isoliert und als "transgene" aber sonst genotypisch herkunfts-30 gleiche Zellen in den adulten Ausgangsorganismus eingebracht. Da diese sich mit Ausnahme des Transgens immunologisch von diesem nicht unterscheiden, sind die Zellen in der Lage, sich im

- Tier zu etablieren und werden gemäß der genetischen Transformation beispielsweise rekombinante Stoffe produzieren.
- Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung von Zellen, Geweben oder Organen in tierischen Organismen, bei dem in einem ersten Schritt Zellen eines Individuums isoliert werden, die Zellen in einen immun-inkompetent tierischen Organismus eingebracht werden, der tierische Organismus gezüchtet wird, die in dem Organismus gewachsenen, Zellen des Individuums isoliert werden, und die isolierten Zellen in ein Individuum eingebracht werden.
- Dieses Verfahren eignet sich insbesondere zum Züchten von Zellen, Geweben und Organen, vorzugsweise menschlichen Ursprungs, in tierischen Organismen, da die Zellen in dem tierischen Empfängerorganismus vermehrt werden bzw. auch zu Geweben und Organen wachsen.
- Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden die Zellen des Ausgangsindividuums, bzw. die daraus gewachsenen Gewebe oder Organe wieder in das gleiche Individuum zurückgebracht, aus dem sie entnommen wurden, wobei Gewebe bzw. Organe zur Verfügung gestellt werden können, die bei einer Rückführung (Transplantation) in das Individuum nicht abgestoßen werden.
- Als immun-inkompetenter tierischer Organismus wird jedes Tier, bzw. Fetus bzw. tierischer Embryo/Zellaggregat verstanden, das die von dem Ausgangsindividuum abgeleiteten Zellen nicht abstößt. Dazu eignen sich neben immun-defizient gemachten tierischen Organismen insbesondere Organismen, die sich in einer derart frühen Entwicklungsstufe befinden, während der das sich entwickelnde Immunsystem noch nicht gelernt hat zwischen eigen und fremd zu unterscheiden.
- Werden daher Zellen des Ausgangsindividuums in einen derartigen Empfängerorganismus eingebracht, dann werden diese Zellen nicht abgestoßen sondern im wesentlichen als eigen erkannt und entsprechend weiterentwickelt.
- Als tierischer Empfängerorganismus eignen sich daher vorzugsweise tierische Organismen, die durch Klonierung erhalten wurden. So ist es möglich mehrere Feten bzw. Embryos oder Zellaggregate auf Vorrat zu halten und nach Bedarf mit den Zellen des Ausgangsindividuums zu behandeln. Die Feten/Embryos/Zellaggregate werden anschließend bis zu einem Stadium

wachsen gelassen, in dem sie die gewünschte Wirkung erbracht haben, beispielsweise bis zur Entwicklung des reifen Organs oder Gewebes oder auch bis zur Entwicklung einer ausreichenden Menge an Zellen des Ausgangsindividuums. Dieses Gewebe/Organ bzw. diese Zellen werden anschließend gewonnen, beispielsweise indem dem Tier das Organ entnommen wird, und in das 5 Ausgangsindividuum überführt. Je nach Entfernung eines bestimmten Organs wird dies natürlich die Tötung des Tiers beinhalten.

Die Zellen des Ausgangsindividuums können in einen herkömmlichen Empfängerorganismus eingebbracht werden. In diesem Fall ist zu erwarten, daß das Tier die Zellen/das Gewebe/das 10 Organ chimär mit seinen eigenen Zellen/Gewebe/Organ ausbildet. Um sicherzustellen, daß in das Ausgangsindividuum nur seine "eigenen" Zellen zurückgeführt werden kann das entsprechende Gewebe/Organ/die Zellen insgesamt isoliert und die tierischen Zellen abgetrennt werden, was beispielsweise mittels Markierung unter Verwendung von gegen die tierischen Zellen gerichteter Antikörper sowie Auf trennung mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) erreicht 15 werden kann.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden jedoch die betreffenden Zellen/Gewebe/Organe aus dem Empfängerorganismus vorab entfernt, was wie vorstehend beschrieben erfolgen kann.

20

So werden beispielsweise bei einem fetalen Empfängerorganismus, bei dem die Organanlage entfernt wurde, die entsprechenden organspezifischen Stammzellen des Ausgangsindividuums, wie beispielsweise adulte humane Stammzellen, die direkt aus dem betroffenen Organ gewonnen werden, in den Fetus eingebracht und werden dann im Fetus die depletierten Zellen ersetzen und 25 das entsprechende Organ bilden. Dadurch entsteht ein chimärer Organismus, der ein Xenoorgan enthält, das zur Transplantation geeignet ist. Das betreffende Organ stellt im tierischen Organismus ein Xenoorgan dar, das jedoch wegen der fehlenden Immunkompetenz des Fetus nicht abgestossen wird. Nach erfolgter Transplantation auf das Ausgangsindividuum, beispielsweise einen menschlichen Patienten, wird, wenn menschliche Stammzellen verwendet wurden, 30 kein xenogenes sondern ein allogenes Transplantat vorliegen, oder ggf. sogar ein autologes Transplantat, wenn das Organ aus adulten Stammzellen eben dieses Individuums/Patienten

entstanden ist, was bei bestimmten Organen und Krankheiten trotz des Zeitbedarfs von etwa einem Jahr möglich ist (z.B. Niere oder Leber).

Die Nutzung des vorliegenden Verfahrens erlaubt somit die Generierung von Zellen, Geweben
5 bzw. Organen innerhalb einer kurzen Zeitspanne, so daß sogar bestimmte Patienten selbst schnell mit Organen mit einem im wesentlichen oder absolut gleichen MHC-Typ versorgt werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren löst daher die gegenwärtig bestehenden Probleme der Knappheit an verfügbaren Organen/Geweben für die Transplantation.

10 Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung ohne sie einzuschränken. In den Beispielen wird die Gewinnung von bispezifischen Antikörpern aus dem Serum von nicht transgenen Klonkübern mit transgenen Blutstammzellen beschrieben. Zur Generierung von Kübern mit transgenen Knochenmarkszellen werden folgende Schritte durchgeführt, wobei für die Details auf die PCT/EP98/00230 bzw. PCT/EP98/0029 verwiesen wird, die hier unter Bezugnahme mit aufgenommen werden.
15

1. Gewinnung und genetische Transformation von primären bovinen fetalen Fibroblasten
2. Klonierung durch Nukleustransfer und Transfer transgener Embryonen auf Empfängertiere
3. Gewinnung der Feten und Isolation transgener Knochenmarkstammzellen aus der fetalen Leber
20
4. Transfusion dieser transgenen Zellen in vorhandenen Klonkübler des gleichen chromosomal Genotyps
5. Gewinnung von Serum durch Blutentnahme
6. Lyse von Tumorzellen mittels bispezifischer Antikörper

25

Beispiel 1

1. Gewinnung/genetische Transformation von primären bovinen fetalen Fibroblasten (BOFFs)
 - a) Untersuchung der Sensitivität von bovinen fetalen Fibroblasten (BOFFs) gegenüber verschiedenen Antibiotika (Selektionsmarker)

BOFFs wurden semikonfluent ausplattiert und die Sensitivität gegenüber Neomycin (G418), Hygromycin und Puromycin in bezug auf Konzentration und Wirkung/Zeit untersucht. Verschie-

dene Präparationen von BOFFs zeigten in Bezug auf die notwendigen Antibiotikakonzentrationen deutliche Unterschiede (bis 2-100x), um die LD₁₀₀ zu erreichen. Die Zeit/Wirkungsfenster zwischen und innerhalb der Präparationen waren teilweise stark verschoben. Die besten Ergebnisse wurden mit Puromycin in einer Konzentration von 1,5 µg/ml erzielt (3 - 5 fache Konzentration gegenüber Selektion von stabilen humanen oder murinen Fibroblastenzelllinien).

Verschiedene Transfektionsmethoden, die üblicherweise zur Transfektion von etablierten Zelllinien verwendet werden, wurden auf ihre Effizienz (Antibiotika-resistente Klone/Transfektionsansatz) bei BOFFs getestet. Getestet wurden:

- 10 DOSPER (Roche, Lipofectin, polycationische Lipide);
LIPOFECTAMINETM (GIBCOBRL Life Technologies, Lipofection, polycationische Lipide);
CLONfectinTM (Clontech, Lipofection, cationische und amophile Lipide);
TransFastTM (Promega, Lipofection, cationische und amphophile Lipide);
15 Ca₃(PO₄)₂-DNA-Präzipitation.

Die besten Ergebnisse wurden mit Lipofectin mittels TransFastTM und Transfektion von Ca₃(PO₄)₂-DNA-Präzipitaten in Anwesenheit von 12% DMSO erzielt.

- 20 Im Gegensatz zu etablierten Fibroblasten-Linien, die ohne Probleme in starker Verdünnung selektiert werden können, so dass Antibiotika-resistente Klone entstehen, können BOFFs nicht unter einer bestimmten kritischen Dichte platziert werden. Bei der Selektion auf Einzelzell-Klone bzw. bei dem Wachstum aus extremer Verdünnung, um Einzelzell-Klone zu isolieren, sterben BOFFs entweder ab, oder durchlaufen eine oder mehrere Krisen, die zu Veränderungen der
25 Morphologie und/oder des Proliferationsverhaltens führen. Die Plattierungsdichte der BOFFs wurde daher derart gewählt, dass ein optimales Wachstum gewährleistet war. Daraus resultiert jedoch, dass die Antibiotika-resistenten Zellen eine Population darstellen und nicht klonalen Ursprungs sind. Durch anschließende Vereinzelung und Subklonierung werden transgene klonale Zelllinien generiert

b) Transfektion mit ScFv und pJW6puro in BOFFs

Verwendete Plasmide:

MAR::ScFv: die MAR Sequenzen (chicken lysozyme gene matrix attachment regions; Castilla et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998), 349) wurden mit ScFv in BlueScript (Stratagene) kloniert.
 5 p77 (Brem et al., Theriogenology 43 (1995), 175) in pUC18 (Norrander et al., Gene 26 (1983), 101).

pJW6puro (Morgenstern & Land, Nucleic Acids Res. 18, 1068) p77 und MAR::ScFv wurden
 10 linearisiert, um eine funktionelle Integration der Konstrukte zu garantieren. Aufgrund der zur Verfügung stehenden Restriktionsenzymschnittstellen konnten dabei die Vektorsequenzen nicht von den Genkonstruktsequenzen getrennt werden. pJW6puro wurde zirkulär/supercoiled transfiziert. Die verwendeten DNA-Mengen bzw. das Mischungsverhältnis ScFv : Selektionsmarker betrug 8:1 ($2,5 \mu\text{g}$ p77 + $2,5 \mu\text{g}$ MAR::ScFv + $0,6 \mu\text{g}$ pJW6puro = $5,6 \mu\text{g}$ Gesamt-DNA)
 15 bzw. 3:1 ($0,7 \mu\text{g}$ p77 + $0,9 \mu\text{g}$ MAR::ScFv + $0,6 \mu\text{g}$ pJW6puro = $2,2 \mu\text{g}$ Gesamt-DNA).

Dabei wurden BOFF #32330201 p1 Zellen verwendet, aus denen mehr als ein Jahr vor der Transefektion bereits durch Klonierung Embryonen und nach Transfer auch Klonkälber (10 Kälber geboren) erstellt wurden. Nach der Trypsinbehandlung wurde die Zellsuspension in 10 mm Kulturschalen überführt und mit Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (Gibco, Grand Island, NY), ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin), 2mM L-Glutamin, 10-4 mM 2-Mercaptoethanol, 2 mM nicht-essentielle Aminosäuren (Sigma, St. Louis, MO), 100 IU/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, kultiviert. Die Zellen werden bei 37°C, in 5% CO₂ in Luft kultiviert, bis der Zellrasen subkonfluent war (2 bis 3 Tage) worauf ein Teil dieser
 20 "Passage 0" eingefroren (10% Dimethylsulfoxid, Sigma) und in flüssigem Stickstoff gelagert wurde.
 25

Transfektionsansätze: BOFFs wurden vor der Transfektion sub-semi-konfluent (ca 5×10^4 - 10^5 Zellen) in 6-well Kulturschalen (\varnothing 35 mm) plattiert (MEM, 15% FCS, 1x Glutamin/Penicillin/Streptamycin). Die Transfektion erfolgte nach dem Absetzen und der Ausprägung der Fibroblasten-Morphologie der Zellen. Pro \varnothing 35 mm-Schale wurde ein Transfektionsexperiment durchgeführt. Transfast® Lipofection: Verhältnis DNA : Liposom = 1 : 2,

Inkubationszeit 1,5 Std.

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -DNA-Präzipitat Transfektion:

- Nach einer Inkubationszeit von 4 Std. wurde die Transfektionseffizienz durch Zugabe von 12%
5 DMSO für 2 min erhöht (Müller et al., EMBO J. 12 (1993), 4221).

Selektion, Erstellung und Analyse von Transfektanten-Pools:

- Das Selektionsmedium wurde 24 Std. nach der Transfektion zugegeben. Nach 2 Tagen Selektion
in 6-well Kulturschalen wurden die Zellen eines Ø 35 mm-wells 1 : 150 auf eine 24-well Schale
10 aufgeteilt (Konzentration $2-8 \times 10^2$ Zellen/Schale). Die Selektion wurde fortgesetzt bis die
Schale subkonfluent mit puro®-BOFFs bewachsen war (4-9 Tage). Die Pools wurden expandiert,
kryo-konserviert und auf erfolgreiche Transfektion mit p77 und MAR::ScFv mittels PCR getestet.

Screening nach ScFv Transfektanten:

- 15 Primer 377L2/f 5'-CAGGTGTCCTCTCTGACATCG-3', und
377R2 5'CGCAGAGTCCACAGAGG-3'
(Annealing Temperatur, 66°C; 1 kb Amplifikat).

Screening nach p77 Transfektanten:

- 20 Primer: 246 5'-GAAGACCCCATTGTCCCAAG-3', und
251 5'-GTCCCGAGGTAGATCTTCCC-3'
(Annealing Temperatur, 62°C; 2,5 kb Amplifikat) bzw.
Primer 248 5'-GATGCTTCTCTATTCTCTG-3', und
251 5'-GTCCCGAGGTAGATCTTCCC-3'
25 (Annealing Temperatur, 60°C; 1,2 kb Amplifikat)

PCR Ergebnisse:

Transfast® Lipofection: bei beiden getesteten DNA-Verhältnissen keine p77/MAR::ScFv positiven Pools.

- 30 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -DNA-Präzipitat Transfektion: DNA-of-Interest : Selektionsmarker = 3:1: keine p77/MAR::ScFv positiven Pools.
 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -DNA-Präzipitat Transfektion: DNA-of-Interest : Selektionsmarker = 8:1 (Pool 3): 6

von 24 Pools positiv für p77 und MAR::ScFv Bezeichnung der positiven Klone/Pools: A3, B2, B3, C2, C3, C6 (stärkstes Signal)

Beispiel 2

- 5 Die Tiere wurden gemäß dem in der PCT/EP98/00229 beschrieben Verfahren kloniert und die transgenen Embryonen auf die Empfängertiere transferiert.

Beispiel 3

- Gewinnung der Feten und Isolation transgener Knochenmarkstammzellen aus der fetalen Leber
10

Transgene Rinderfeten werden im zweiten Trimester der Gravidität gewonnen. In dieser Zeit, der hepato-linealen Periode der Fetalentwicklung, ist die Leber der Hauptort der Blutbildung und der Sitz der Stammzellen aller Blutzellen, der Hämozytoblasten. Aus diesen Hämozytoblasten entwickeln sich nach Einwanderung in die Markhöhle der Knochen im Rahmen der Lymphocytopoese auch die B-Lymphozyten. Die fetale Leber wird aseptisch gewonnen und in RPMI Medium mit 4 µg Gentamycinsulfat und 200 IU/ml Heparin als Antikoagulans aufgenommen. Eine Separation in Einzelzellen erfolgt unter streng sterilen Kautelen.
15

Beispiel 4

- 20 Transfusion der transgenen Zellen in Klonkübel des gleichen chromosomal Genotyps

Die Transplantation der fetalen Blutbildungszellen erfolgt in einer Suspension in physiologischer Kochsalzlösung oder Medium durch intravenöse Infusion mittels Katheter (14 Gauge, 1.7mm x 64 mm, Terumo Co. Ltd).

25

Beispiel 5

Gewinnung und Reinigung von Serum durch Blutentnahme

In regelmässigen Abständen nach Transfusion der transgenen Blutbildungszellen wird durch
30 Punktion der Vena jugularis Blut gewonnen. Durch Zentrifugation des Blutes (1000xg, 30 min.) wird das Serum von den Blutzellen getrennt. Das Serum wird mit Natriumazid (Endkonzentration 0,02%) versetzt und durch Celluloseacetatfilter (0,22 µm) filtriert. Der Überstand wird mit 1 M NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Zur bi-scFv-Molekülaufreinigung wird der

Kulturüberstand über eine mit 0,1M Natriumposphatpuffer equilierte Protein L-Agarose Säule (# 20520 Pierce, Rockford IL, USA) gegeben (Protein L bindet humanes IgG insbesondere auch Single chain variable elements (ScFv) aber nicht bovines IgG1 und IgG2). Das Säulen-Bett wird nach dem Auftrag des Kulturüberstandes mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Die gebundenen 5 Proteine werden durch einen 0,1 M Glycin-Puffer stufenweise bei pH-Werten von 3,0 und 2,0 eluiert. Das aufgefangene Eluat wird über Nacht gegen PBS dialysiert, 0,22 µm sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Beispiel 6

10 Lyse von Tumorzellen mittels bispezifischer Antikörper

Die biologische Aktivität der bispezifischen Antikörper wird im Zytotoxizitätstest mit 5000 SK-Mel63 oder M21 Tumozellen getestet. Diese beiden Melanom-Zelllinien sind für das Target Antigen HMWG (high molecular weight glycoprotein), welches durch den monoklonalen 15 Antikörper (nur scFv-Anteil) 9.2.27 erkannt wird, stark positiv. Periphere Blut-Lymphozyten (PBLs frisch von gesundem humanem Spender gewonnen und durch Ficoll-Gradient isoliert) werden im Verhältnis 10:1 zu den Targetzellen zugegeben. Dann erfolgt eine Zugabe von 150 µg/ml chemisch konjugierten bs-F(ab')2 der Spezifität 9.2.27 x CD3 (Melanom x T-Lymphozyt in alle Zellkulturschalen zur panklonalen Stimulation aller T-Lymphozyten, zeigt bei dieser 20 Konzentration allein keine mitogene Eigenschaft). Anschliessend werden die aus dem Serum gereinigten rekombinanten bi-scFv-Moleküle direkt zugegeben. Das Gesamtvolume des Versuchsansatzes pro Zellkulturschale in der Mikrotiterplatte ist 150 µl. Die Inkubation der Platte erfolgt für 5 Tage im Brutschrank bei 37°C/5% CO₂. Die nicht adhärenten Blut-Lymphozyten werden durch mehrfaches Waschen mit PBS entfernt, so dass nur noch die restlichen adhärenten 25 Tumorzellen in den Zellkulturschalen verbleiben (visuelle Kontrolle). In die Zellkulturschalen werden 100 µl frischen Medium und 10 µl des Cell Proliferation Reagent Farbstoffes WST (Boehringer Mannheim, Cat. No. 1644 807) zugegeben. Anschließend erfolgt eine erneute Inkubation (37°C/5% CO₂) im Brutschrank für 1 bis 4 Stunden und dann eine Auswertung per ELISA-Reader (480 nm). Die visuelle Auswertung und die niedrige optische Dichte zeigen ein 30 Tumorzell-Killing von 100%. Damit ist gezeigt, dass rekombinante bispezifische Antikörper, die in transgenen Blutzellen produziert werden, hocheffizient sind.

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Stoffen, bei dem
a) Zellen mit einer den Stoff codierenden Nukleotid-Sequenz transformiert werden,
b) die transformierten Zellen einem Klonierungsprozess unterworfen werden, und
c) die in Schritt b) erhaltenen Zellen in einen Empfängerorganismus eingebracht werden.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die in Schritt a) zu transformierenden Zellen vor der Transformation einem Klonierungsprozess unterworfen werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die in Schritt a) zu transformierenden Zellen aus einem vorhandenen Zellklon oder einem vorhandenen Organismus isoliert werden.
- 15 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der Empfängerorganismus ein Tier, ein Fetus, ein Embryonen bzw. Zellaggregat ist.
- 20 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem im Empfängerklon bestimmte Zelltypen entfernt werden und diese durch rekombinante Zellen des gleichen Typs ersetzt werden.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der Empfängerorganismus den gleichen Genotyp aufweist, wie die zu transformierenden Zellen.
- 25 7. Verwendung von transgenen Tieren, hergestellt nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von rekombinanten Stoffen.

8. Verfahren zur Herstellung von Zellen, Geweben oder Organen in tierischen Organismen, bei dem
- a) Zellen aus einem Individuum isoliert werden,
 - b) die Zellen in einen immun-inkompetent tierischen Organismus eingebracht werden,
 - c) der Organismus gezüchtet wird,
 - d) die in dem Organismus gewachsenen, Zellen des Individuums isoliert werden, und
 - e) die isolierten Zellen in ein Individuum eingebracht werden.
- 5
9. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem die Zellen zu Geweben und/oder Organen wachsen und die gewachsenen Gewebe/Organe in das Individuum eingebracht werden.
- 10
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 oder 9, bei dem die Zellen von dem Individuum abgeleitet sind, in das sie zurückgebracht werden.
- 15 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, bei dem der tierische Organismus durch Klonierung erhalten wurde.
- 20
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 9, bei dem in dem tierischen Organismus endogene Zellen eines bestimmten Typs entfernt wurden.
13. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 8 bis 12 zur Herstellung von Transplantaten.
- 25
14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei menschliche Transplantate, insbesondere autologe menschliche Transplantate hergestellt werden.

1/2
SEQUENZPROTOKOLL

<110> ApoGene

<120> Somatischer Klonierungs-Gentransfer zur Produktion von rekombinanten Proteinen, Zellen und Organen

<130> 80264WO

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:ScFv

<400> 1

caggtgtcct ctctgacatc g

21

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:ScFv

<400> 2

cgcagagtcc acagagg

17

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:ScFv

<400> 3

gaagacccca ttttgtccca ag

22

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:ScFv

<400> 4

gtcccgagggt agatcttccc

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:ScFv

<400> 5

gatgcttc tattcctctg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:ScFv

<400> 6

gtcccgagggt agatcttccc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/07239

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A01K67/027 A61K48/00 A61K35/12 A61K35/28 C07K16/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A01K A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 35906 A (WENIGERKIND HENDRIK ;MUELLER SIGRID (AT); WOLF ECKHARD (AT); SCHER) 22 July 1999 (1999-07-22) cited in the application claims 4,8-14 ---	1,3,4,7, 13,14
X	WO 99 36510 A (WENIGERKIND HENDRIK ;MUELLER SIGRID (AT); WOLF ECKHARD (AT); SCHER) 22 July 1999 (1999-07-22) cited in the application claims 4,8-14 ---	1,3,4,7, 13,14
X	WO 98 30683 A (UNIV MASSACHUSETTS A PUBLIC IN) 16 July 1998 (1998-07-16) claims 23,55-68 ---	1,3,4,7, 13,14 -/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 July 2001

Date of mailing of the international search report

08/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lonnoy, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/07239

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 37183 A (KIND ALEXANDER JARVIS ;PPL THERAPEUTICS SCOTLAND LTD (GB); SCHNIEK) 27 August 1998 (1998-08-27) examples 3,4,6 ---	1-4,7
X	SCHNIEKE A E ET AL: "HUMAN FACTOR IX TRANSGENIC SHEEP PRODUCED BY TRANSFER OF NUCLEI FROM TRANSFECTED FETAL FIBROBLASTS" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 278, no. 5346, 19 December 1997 (1997-12-19), pages 2130-2133, XP002067036 ISSN: 0036-8075 table 1 ---	1-4,7
X	CIBELLI J B ET AL: "CLONED TRANSGENIC CALVES PRODUCED FROM NONQUIESCENT FETAL FIBROBLASTS" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 280, 22 May 1998 (1998-05-22), pages 1256-1258, XP000786003 ISSN: 0036-8075 figures 1,2 ---	1-4,7
X	COLMAN A ET AL: "Therapeutic cloning: concepts and practicalities" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY,NL,ELSEVIER, AMSTERDAM, vol. 18, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 192-196, XP004195999 ISSN: 0167-7799 figure 1 ---	1-4,6,7, 13,14
Y	KATZENSTEIN H ET AL: "Haploidentical related umbilical cord blood stem cell transplant in a child with acute non-lymphocytic leukemia" BONE MARROW TRANSPLANTATION , vol. 19, no. 8, 1997, pages 765-769, XP001010569 abstract ---	5
X	WO 96 39811 A (SANDOZ AG ;SANDOZ LTD (CH); SANDOZ AG (DE); SYSTEMIX INC (US)) 19 December 1996 (1996-12-19) claims 1,5 ---	8-10, 12-14
A	WO 94 24853 A (CANGENE CORP ;KEATING ARMAND (CA); WU DHONG DHONG (CA)) 10 November 1994 (1994-11-10) ---	
A	WO 98 58963 A (WENGLER GEORG S) 30 December 1998 (1998-12-30) ---	
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/07239

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 811 635 A (KOLLMANN TOBIAS R ET AL) 22 September 1998 (1998-09-22) ----	
A	WO 94 27622 A (BESCHORNER WILLIAM E ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 8 December 1994 (1994-12-08) ----	
A	WO 99 09141 A (BIOTRANSPLANT INC) 25 February 1999 (1999-02-25) ----	
A	US 5 639 457 A (BREM GOTTFRIED ET AL) 17 June 1997 (1997-06-17) -----	

ADDITIONAL MATTER PCT/ISA 210

The International Searching Authority found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1-7 : (in full) and 11, 13, 14 (in part)

Method for recombinant production of substances in cells which are transformed with a nucleotide substance coding said substance, the transformed cells undergo a cloning process and the cells thus obtained are inserted into a recipient organism; use of transgenic animals in the production of substances; use of the method for the production of transplants.

Claims Nos. 8-10, 12 (in full) and 11, 13, 14 (in part)

Method for the production of cells, tissues or organs in animal organisms, wherein cells of an individual are isolated, the cells are inserted in an immune-incompetent animal organism, the organism is reared, the cells of the individual that have grown in the organism are isolated, and the isolated cells are inserted into an individual ; use of the method for the production of transplants.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/07239

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9935906	A	22-07-1999	AU EP	6292898 A 1052897 A	02-08-1999 22-11-2000
WO 9936510	A	22-07-1999	AU EP JP	6614498 A 0972017 A 2000512159 T	02-08-1999 19-01-2000 19-09-2000
WO 9830683	A	16-07-1998	US AU BR CN EP US US US	5945577 A 6014598 A 9806872 A 1248288 T 1015572 A 6215041 B 6235969 B 6235970 B	31-08-1999 03-08-1998 18-04-2000 22-03-2000 05-07-2000 10-04-2001 22-05-2001 22-05-2001
WO 9837183	A	27-08-1998	AU EP	6300198 A 1009816 A	09-09-1998 21-06-2000
WO 9639811	A	19-12-1996	AU	6223096 A	30-12-1996
WO 9424853	A	10-11-1994	US AU CA EP JP	6018096 A 6642994 A 2138641 A 0651606 A 7508658 T	25-01-2000 21-11-1994 10-11-1994 10-05-1995 28-09-1995
WO 9858963	A	30-12-1998	DE EP	19726597 C 0923607 A	19-11-1998 23-06-1999
US 5811635	A	22-09-1998	US	6054116 A	25-04-2000
WO 9427622	A	08-12-1994	AU AU EP JP US	693452 B 7044594 A 0700297 A 9500618 T 6060049 A	02-07-1998 20-12-1994 13-03-1996 21-01-1997 09-05-2000
WO 9909141	A	25-02-1999	AU	8827998 A	08-03-1999
US 5639457	A	17-06-1997	DE AU AU CA CS EP HU JP LV LV PL PL RU	4000939 A 627099 B 6867491 A 2034034 A 9100065 A 0438102 A 58819 A, B 5070499 A 10790 A 10790 B 170647 B 171474 B 2095412 C	18-07-1991 13-08-1992 14-11-1991 16-07-1991 15-09-1991 24-07-1991 30-03-1992 23-03-1993 20-08-1995 20-06-1996 31-01-1997 30-05-1997 10-11-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07239

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A01K67/027 A61K48/00 A61K35/12 A61K35/28 C07K16/46

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A01K A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 35906 A (WENIGERKIND HENDRIK ; MUELLER SIGRID (AT); WOLF ECKHARD (AT); SCHER) 22. Juli 1999 (1999-07-22) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 4,8-14 ---	1,3,4,7, 13,14
X	WO 99 36510 A (WENIGERKIND HENDRIK ; MUELLER SIGRID (AT); WOLF ECKHARD (AT); SCHER) 22. Juli 1999 (1999-07-22) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 4,8-14 ---	1,3,4,7, 13,14
X	WO 98 30683 A (UNIV MASSACHUSETTS A PUBLIC IN) 16. Juli 1998 (1998-07-16) Ansprüche 23,55-68 ---	1,3,4,7, 13,14 -/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- ^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
24. Juli 2001	08/08/2001
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Lonnoy, O

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07239

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 37183 A (KIND ALEXANDER JARVIS ;PPL THERAPEUTICS SCOTLAND LTD (GB); SCHNIEK) 27. August 1998 (1998-08-27) Beispiele 3,4,6 ---	1-4,7
X	SCHNIEKE A E ET AL: "HUMAN FACTOR IX TRANSGENIC SHEEP PRODUCED BY TRANSFER OF NUCLEI FROM TRANSFECTED FETAL FIBROBLASTS" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, Bd. 278, Nr. 5346, 19. Dezember 1997 (1997-12-19), Seiten 2130-2133, XP002067036 ISSN: 0036-8075 Tabelle 1 ---	1-4,7
X	CIBELLI J B ET AL: "CLONED TRANSGENIC CALVES PRODUCED FROM NONQUIESCENT FETAL FIBROBLASTS" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, Bd. 280, 22. Mai 1998 (1998-05-22), Seiten 1256-1258, XP000786003 ISSN: 0036-8075 Abbildungen 1,2 ---	1-4,7
X	COLMAN A ET AL: "Therapeutic cloning: concepts and practicalities" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY,NL,ELSEVIER, AMSTERDAM, Bd. 18, Nr. 5, Mai 2000 (2000-05), Seiten 192-196, XP004195999 ISSN: 0167-7799 Abbildung 1 ---	1-4,6,7, 13,14
Y	---	5
Y	KATZENSTEIN H ET AL: "Haploididential related umbilical cord blood stem cell transplant in a child with acute non-lymphocytic leukemia" BONE MARROW TRANSPLANTATION , Bd. 19, Nr. 8, 1997, Seiten 765-769, XP001010569 Zusammenfassung ---	5
X	WO 96 39811 A (SANDOZ AG ;SANDOZ LTD (CH); SANDOZ AG (DE); SYSTEMIX INC (US)) 19. Dezember 1996 (1996-12-19) Ansprüche 1,5 ---	8-10, 12-14
A	WO 94 24853 A (CANGENE CORP ;KEATING ARMAND (CA); WU DHONG DHONG (CA)) 10. November 1994 (1994-11-10) ---	
A	WO 98 58963 A (WENGLER GEORG S) 30. Dezember 1998 (1998-12-30) ---	
		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07239

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 811 635 A (KOLLMANN TOBIAS R ET AL) 22. September 1998 (1998-09-22) ----	
A	WO 94 27622 A (BESCHORNER WILLIAM E ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 8. Dezember 1994 (1994-12-08) ----	
A	WO 99 09141 A (BIOTRANSPLANT INC) 25. Februar 1999 (1999-02-25) ----	
A	US 5 639 457 A (BREM GOTTFRIED ET AL) 17. Juni 1997 (1997-06-17) -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00 07239

WEITERE ANGABEN**PCT/ISA/ 210**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-7 (völlig) und 11,13,14 (teilweise)

Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Stoffen bei dem Zellen mit einer den Stoff codierenden Nukleotid-Sequenz transformiert werden, die transformierten Zellen einem Klonierungsprozess unterworfen werden, und die erhaltenen Zellen in einen Empfängerorganismus eingebracht werden; Verwendung der transgenen Tieren zur Herstellung von Stoffen; Verwendung des Verfahrens zur Herstellung von Transplantaten.

2. Ansprüche: 8-10, 12 (völlig) und 11,13,14 (teilweise)

Verfahren zur Herstellung von Zellen, Geweben oder Organen in tierischen Organismen, bei dem Zellen aus einem Individuum isoliert werden, die Zellen in einen immun-inkompetent tierischen Organismus eingebracht werden, der Organismus gezüchtet wird, die in dem Organismus gewachsenen Zellen des Individuums isoliert werden, und die isolierten Zellen in ein Individuum eingebracht werden; Verwendung des Verfahrens zur Herstellung von Transplantaten.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07239

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
WO 9935906 A	22-07-1999	AU EP	6292898 A 1052897 A		02-08-1999 22-11-2000
WO 9936510 A	22-07-1999	AU EP JP	6614498 A 0972017 A 2000512159 T		02-08-1999 19-01-2000 19-09-2000
WO 9830683 A	16-07-1998	US AU BR CN EP US US US	5945577 A 6014598 A 9806872 A 1248288 T 1015572 A 6215041 B 6235969 B 6235970 B		31-08-1999 03-08-1998 18-04-2000 22-03-2000 05-07-2000 10-04-2001 22-05-2001 22-05-2001
WO 9837183 A	27-08-1998	AU EP	6300198 A 1009816 A		09-09-1998 21-06-2000
WO 9639811 A	19-12-1996	AU	6223096 A		30-12-1996
WO 9424853 A	10-11-1994	US AU CA EP JP	6018096 A 6642994 A 2138641 A 0651606 A 7508658 T		25-01-2000 21-11-1994 10-11-1994 10-05-1995 28-09-1995
WO 9858963 A	30-12-1998	DE EP	19726597 C 0923607 A		19-11-1998 23-06-1999
US 5811635 A	22-09-1998	US	6054116 A		25-04-2000
WO 9427622 A	08-12-1994	AU AU EP JP US	693452 B 7044594 A 0700297 A 9500618 T 6060049 A		02-07-1998 20-12-1994 13-03-1996 21-01-1997 09-05-2000
WO 9909141 A	25-02-1999	AU	8827998 A		08-03-1999
US 5639457 A	17-06-1997	DE AU AU CA CS EP HU JP LV LV PL PL RU	4000939 A 627099 B 6867491 A 2034034 A 9100065 A 0438102 A 58819 A, B 5070499 A 10790 A 10790 B 170647 B 171474 B 2095412 C		18-07-1991 13-08-1992 14-11-1991 16-07-1991 15-09-1991 24-07-1991 30-03-1992 23-03-1993 20-08-1995 20-06-1996 31-01-1997 30-05-1997 10-11-1997